

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 16/22

[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 16/28 A01K 67/027

A61K 39/395 C12N 5/20

C12N 15/13 G01N 33/577

C07K 16/46 A61P 35/00

C12N 15/85



[21] 申请号 00813673.4

[43] 公开日 2003年2月26日

[11] 公开号 CN 1399645A

[22] 申请日 2000.7.25 [21] 申请号 00813673.4

[30] 优先权

[32] 1999.7.29 [33] US [31] 60/146,313

[32] 2000.3.10 [33] US [31] 60/188,539

[86] 国际申请 PCT/US00/20272 2000.7.25

[87] 国际公布 WO/01/09187 英 2001.2.8

[85] 进入国家阶段日期 2002.3.29

[71] 申请人 米德列斯公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 T·凯勒 Y·德奥

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 姜建成

权利要求书4页 说明书56页 序列表10页

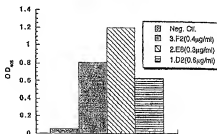
附图24页

[54] 发明名称 HER2/NEU 的人单克隆抗体

[57] 摘要

公开了特异性与 HER2/neu 结合的分离人单克隆抗体及其抗原结合部分。也公开了包含特异性与 HER2/neu 结合的人单克隆抗体及其抗原结合部分的双和多特异性分子。人抗体可以在非人转基因动物如转基因小鼠中产生,可以通过进行 V-D-J 重组和同种型转换产生多种人单克隆抗体同种型。也公开了包含人抗体的药物组合物、产生人抗体的非人转基因动物和杂交瘤,以及使用人抗体的治疗和诊断方法。

图13A测定的 $5\mu\text{g}$ 抗HER2/neu抗体
与重组HER2/neu的结合



为进一步的限制。在此特意引入序列表、图和所有参考文献、在本申请过程中引用的专利和公开的专利申请的内容作为参考。

实施例

5 实施例 1 Cm μ 靶小鼠的产生

CMD 导向载体的建立

- 质粒 pICEmu 包含一个跨 μ 基因，从 Balb/C 基因组 λ 噬菌体文库中获得的鼠 Ig 重链基因座的 EcoRI/XhoI 片段 (Marcu et al. Cell 22: 187, 1980)。此基因组片段被亚克隆到质粒 pICEM19H 的 XhoI/EcoR 位点 (Marsh et al; Gene 32, 481-485, 1984)。包含在 pICEmu 的重链序列从 μ 内含子增强子 3' 端的 EcoRI 位点向下游延伸到 μ 基因最后一个跨膜外显子下游约 1kb 的 XhoI 位点；然而，通过在大肠杆菌中传代，许多 μ 转换重复区域被去除。
- 15 导向载体按如下方法建立 (见图 1)。将一个 1.3kb 的 HindIII/SmaI 片段从 pICEmu 切除并亚克隆到 HindIII/SmaI 消化的 pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA)。此 pICEmu 片段从位于 Cm μ 5' 端约 1kb 的 HindIII 位点延伸到 Cm μ 内部的 SmaI 位点。产生的质粒用 SmaI/SpeI 消化，然后插入一个约 4kb 的从 pICEmu 得
- 20 到的，从 Cm μ 3' 端的 SmaI 位点延伸到最后一个 Cm μ 外显子下游的 XbaI 位点的 SmaI/XbaI 片段。产生的质粒 pTAR1 在 SmaI 位点被线性化，插入一个 neo 表达盒。该盒包含一个在小鼠磷酸甘油激酶 (pkg) 启动子 (XbaI/TaqI 片段; Adra et al. (1987) Gene 60: 65-74) 转录控制下并包含 pkg 聚腺苷酸化位点 (PvuII/HindIII 片段; Boer et al. (1990) Biochemical Genetics 28: 299-308) 的 neo 基因。该盒从质粒 pKJ1 (Tybulewicz et al. (1991) Cell 65:1153-1163 有描述) 得到，neo 盒作为 EcoRI/HindIII 片段被切除并亚克隆到 EcoRI/HindIII 消化的 pGEM-7Zf (+) 而产生 pGEM-7 (KJ1)。Neo 盒从 pGEM-7 (KJ1) 通过 EcoRI/SalI 消化被切除，为平端，并被亚克隆到
- 30 质粒 pTAR1 的 SmaI 位点，与基因组 Cm μ 序列方向相反。产生的质粒被 Not I 线性化，插入一个单纯疱疹病毒胸腺嘧啶激酶 (tk) 盒，这样可以允许有同源重组的 ES 克隆富集，如 Mansour et al. (1988)

Nature 336:348-352 的描述。该盒包含了其两端为小鼠 pgk 启动子和聚腺苷酸化位点的 tk 基因编码序列,如 Tybulewicz et al. (1991) Cell 65:1153-1163 的描述。产生的 CMD 导向载体包含与重链基因座总共约 5.3kb 的同源性,并设计产生在第一个 Cmu 外显子的唯一 SmaI 位点插入 neo 表达盒的突变 mu 基因。导向载体在电穿孔到 ES 细胞之前,用在质粒序列内部剪切的 PvuI 线性化。

靶 ES 细胞的产生和分析

AB-1 ES 细胞 (McMahon, A. P. and Bradley, A., (1990) Cell 62:1073-1085) 在有丝分裂不活跃的 SNL76/7 细胞饲养层 (ibid.) 上生长,基本如 (Robertson, E. J. (1987), Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach (E. J. Robertson, ed.) Oxford: IRL Press, p. 71-112) 所描述。线性化的 CMD 导向载体通过 Hasty 等描述的方法 (Hasty, P. R. Et al. (1991) Nature 350:243-246) 被电穿孔到 AB-1 细胞中。被电穿孔的细胞以 $1-2 \times 10^6$ 个细胞/平皿的密度被平铺到 100mm 的平皿。24 小时后,将 G418 (200mg/ml 活性成分) 和 FIAU (5×10^{-7} M) 加入培养基,抗药克隆允许培养 8-9 天。挑选克隆,用胰蛋白酶消化,分为两部分,并进一步展平。然后从每个克隆得到的细胞的一半被冷冻,另一半为进行载体和靶序列之间的同源重组而进行分析。

DNA 分析通过 DNA 印迹杂交执行。按 Laird 等描述的方法 (Laird, P. W. et al., (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4293) 将 DNA 从克隆中分离。分离的基因组 DNA 用 SpeI 消化并用一个与 mu 内含子增强子和 mu 转换区之间的序列杂交的 915bp 的 SacI 片段即探针 A (见图 1) 探测。探针 A 检测野生型基因座的一个 915bp 的 SacI 片段和 mu 基因座的一个与 CMD 导向载体同源重组 (neu 表达盒包含一个 SpeI 位点) 的 7.6kb 的鉴别带。在 DNA 印迹分析筛选的 1132 个抗 G418 和 FIAU 克隆中,3 个显示出了提示 mu 基因座同源重组的 7.6kb 的 SpeI 带。用酶 BglII, BstXI 和 EcoRI 进一步消化这 3 个克隆,证明载体被同源性整合到 mu 基因中。当与探针 A 杂交后,用 BglII, BstXI 或 EcoRI 消化的野生型 DNA 的印记分别产生 15.7, 7.3 和 12.5kb 的片段,而靶 mu 等位基因的存在分别由 7.7, 6.6, 和 14.3kb 的片段提示。

由 SpeI 消化检测的所有 3 个阳性克隆表现出预期的鉴别 neo 盒插入 Cm1 外显子的 BglI, BstXI 和 EcoRI 限制片段。

具有突变 mu 基因的小鼠的产生

- 5 将这三个编号为 264, 272 和 408 的靶 ES 克隆融化并按 Bradley 在 Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach (E. J. Robertson, ed.) Oxford: IRL Press, p. 113-151) 中描述的方法注射入 C57BL/6J 胚胎。将被注入的胚胎转移到假
- 10 孕雌性小鼠中产生表现从引入 ES 细胞和宿主胚胎细胞衍生的细胞混合的嵌合小鼠。ES 细胞对嵌合体的贡献可以由 C57BL/BJ 黑色背景上的从 ES 细胞系衍生的灰色皮毛颜色数量用肉眼估计。克隆 272 和 408 只产生低百分比的嵌合体 (即低百分比灰色色素), 但克隆 264 产生高百分比的雄性嵌合体。这些嵌合体与 C57BL/J6 雌鼠杂交并产生灰色后代, 提示 ES 细胞基因组的种系转移。对靶 mu 基因的筛选是通过
- 15 对尾部解剖得到的 DNA 用 BglI 消化进行 DNA 印迹分析而执行的 (如前面所描述的 ES 细胞 DNA 分析)。约 50% 的灰色后代除了野生型的 15.7kb 带, 也表现出 7.7kb 的杂交 BglI 带, 证明了靶 mu 基因的种系转移。

mu 基因功能性灭活的转基因小鼠的分析

- 20 为判断 neo 盒插入到 Cm1 是否灭活了 Ig 重链基因, 将一只克隆 264 的嵌合体与一只 JHD 突变纯合小鼠杂交, JHD 突变由于去除 JH 基因段而导致重链表达失活 (Chen et al, (1993) Immunol. 5:647-656)。产生四只灰色后代。从 1 月龄的这些动物中得到血清并用 ELISA 测定鼠 IgM 的存在。四只后代中的两只完全缺失 IgM (见表 1)。从尾部解剖得到的 DNA 用 BglI 消化并与探针 A 杂交, 以及通过用 StuI 消化并与一个 475bp 的 EcoRI/StuI 片段 (ibid) 杂交, DNA 印迹分析测定的四只动物的基因型证明, 不能表达血清 IgM 的动物重链基因座中的一个等位基因有 JHD 突变, 另一个有 Cm1 突变。
- 30 JHD 突变的杂合小鼠显示野生型水平的血清 Ig。这些资料证明 Cm1 突变灭活 mu 基因的表达。

表 1

小鼠	血清IgM (mg/ml)	IgH链基因型
42	<0.002	CMD/JHD
43	196	+/JHD
44	<0.002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129 × BL6 F1	153	+/+
JHD	<0.002	JHD/JHD

表 1 表示由 ELISA 检测的, 有 CMD 和 JHD 突变 (CMD/JHD) 的小鼠, JHD 突变杂合子小鼠 (+/JHD), 野生型 (129SV × C57BL/6J) F1 小鼠 (+/+) 及 B 细胞缺陷 JHD 突变纯合小鼠 (JHD/JHD) 的血清 IgM 水平。

实施例 2 HC012 转基因小鼠的产生

HC012 人重链转基因

HC012 转基因通过共同注射 80kb 的 pH C2 插入片段 (Taylor et al., 1994, Int. Immunol., 6:579-591) 和 25kb 的 pVx6 插入片段产生。质粒 pVx6 按如下方法建立。

一个包含种系人 VH1-18 (DP-14) 基因以及约 2.5kb 的 5' 侧翼和 5kb 的 3' 侧翼基因组序列的 8.5kb 的 HindIII/SalI DNA 片段被亚克隆到质粒载体 pSP72 (Promega, Madison, WI) 产生质粒 p343.7.16。一个包含种系人 VH5-51 (DP-73) 基因以及约 5kb 的 5' 侧翼和 1kb 的 3' 侧翼基因组序列的 7kb 的 BanHI/HindIII DNA 片段被克隆到基于 pBR322 的质粒克隆载体 pGP1f (Taylor et al. 1992, Nucleic Acids Res. 20:6287-6295) 产生质粒 p251f。从 pGP1f 衍生的一个新克隆载体 pGP1k (SEQ ID NO:13) 被 EcoRV/BamHI 消化并与一个包含种系人 VH3-23 (DP-47) 基因以及约 4kb 的 5' 侧翼和 5kb 的 3' 侧翼基因组序列的 10kb 的 EcoRV/BamHI DNA 片段连接。产生的质粒 p112.2RR.7 被 BamHI/SalI 消化并与 p251f 的 7kb 的纯化 BamHI/SalI

插入片段连接。产生的质粒 pVx4 用 XhoI 消化并与 p343.7.16 的 8.5kb 的 XhoI/SalI 插入片段连接。

- 获得了一个 VHI-18 基因与另外两个 V 基因方向相同的克隆。然后这个称为 pVx6 的克隆被 NotI 消化, 按 Hogan 等的描述 (B. Hogan et al., Manipulating the Mouse embryo, A Laboratory Manual, 2nd edition, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY), 纯化的 26kb 插入片段与纯化的 pHc2 的 80kb NotI 插入片段以 1:1 的摩尔比共同注射到半天的 (C57BL/6J × DBA/2J) F2 胚胎原核中。从注入的胚胎发育的小鼠建立了三个包含从 Vx6 和 HC2 得到的序列的独立转基因小鼠系。这些系被指定为 (HC012) 14881, (HC012) 15083, (HC012) 15087。然后将这三个系的每一个与包含例 1 中描述的 CMD 突变、JKD 突变 (Chen et al. 1993, EMBO J. 12:811-820) 和 (Kco5)9272 转基因 (Fishwild et al. 1996, Nature Biotechnology 14:845-851) 的小鼠杂交。产生的小鼠在破坏内源性小鼠重链和 κ 轻链基因座为纯合的背景下表达人重链和 κ 轻链转基因。

实施例 3 抗 HER2/neu 的人单克隆抗体和双特异性分子的产生

- 用下面三种来源衍生的 HER2/neu 抗原免疫 HC07 和 HC012 株 HuMab 小鼠产生人抗 HER2/neu 单克隆抗体: 1) 表达高水平 HER2/neu, 在标准状况下生长、收获并用 PBS 冲洗的人乳腺癌细胞 SKBR-3 和 BT-474, 2) 用鼠抗 HER2/neu 单克隆抗体和抗鼠 IgG 琼脂糖凝胶免疫沉淀的 SKBR-3 细胞裂解产物; 和 3) 从 SKBR-3 细胞脱落并用鼠抗 HER2/neu 单克隆抗体亲和层析而纯化的 HER2/neu. HC07 HuMab 小鼠按美国专利 5,545,806, 5,625,825, 和 5,545,807 中的描述产生, 在此引入其完整公开作为参考。

- 特别是, HC07 和 HC012 小鼠首先用在完全弗氏佐剂中乳化的抗原免疫。在随后的免疫中, 抗原与不完全弗氏佐剂混合。最后, 在脾切除前用纯化抗原进行静脉内注射抗原, 没有佐剂。每 2-3 周对小鼠免疫一次。在第三次之后和以后的免疫中, 用 ELISA (见下面的描述) 判断人 IgG 抗 HER2/neu 抗体滴度。产生抗 HER2/neu IgG 应答的小

鼠在脾切除前用纯化抗原静脉注射三天或三天和四天,获取应答小鼠的脾并分散为单细胞。

- 为产生抗 HER2/neu 抗体的杂交瘤,从血浆中含有 HER2/neu 抗体的小鼠得到的脾细胞与 P3X63-Ag8.653 细胞(保藏于 ATCC,指定为
- 5 ATCC CRL 1580 非分泌性小鼠骨髓瘤细胞)和 PEG 融合。在杂交瘤长出来后(约 10-14 天),用抗人 IgG ELISA 筛选每个包含杂交瘤的加样孔是否产生人 IgG。用 HER2/neu ELISA 进一步检验阳性杂交瘤的抗原特异性。

- 简言之,在 PBS 中用 0.25 μ g/ml 的纯化 HER2/neu 包被微型滴定
- 10 板,然后用溶于 PBS 的 5%牛血清白蛋白(BSA)终止。将从产生抗 HER2/neu 的杂交瘤得到的上清液加入每个加样孔并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1-2 小时。用 PBS/Tween 漂洗微型滴定板,然后用碱性磷酸酶连接的山羊抗人 IgG Fc 特异性多克隆试剂在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。在漂洗后,将微型滴定板用 pNPP 底物(1mg/ml)显影,在 405nm 的波长下用微型滴
- 15 定板读出器读取样品。图 2A 描述了 ELISA 测量的从杂交瘤 3.F2, 2.E8 和 1.D2 培养物得到的三种上清液与重组 HER2/neu 的结合。有意义的结合由与培养基对照比较而表示的三种抗 HER2/neu 杂交瘤上清液而检测。

- 为纯化人单克隆抗体,将一些分泌对 HER2/neu 有特异性的人 IgG
- 20 抗体的杂交瘤进行亚克隆并展平。从包含 5%CO₂ 的湿润孵育箱中的滚瓶中生长的杂交瘤培养物上清液中分离单克隆抗体。根据生产商的详细说明通过蛋白 A-琼脂糖凝胶柱层析对抗体进行纯化(Pierce, Rockford IL)。

- 用小鼠抗 Her2/neu 抗体包被微型滴定板,用 5%的 BSA 封闭,用
- 25 过度生长的 SKBR-3 细胞的上清液孵育,从而获得细胞脱落的 HER2/neu。然后用不同浓度的人抗 HER2/neu 单克隆抗体或同种型对照(人 IgG1)孵育滴定板。用前面描述的方法测定与固定化的 HER2/neu 结合的人抗 HER2/neu 抗体。图 2B 特别表示了 ELISA 测定的抗体 3.F2, 2.E8, 1.D2, 1.B10, 3.B4 与重组 HER2/neu 的结合。

- 30 产生(由 ELISA 测定的)与 HER2/neu 结合的人 IgG 的杂交瘤可以按照下面的描述进一步通过 ELISA 和流式细胞仪鉴定同种型、与表达 HER2/neu 的肿瘤细胞的结合、缺乏与 HER2/neu 阴性细胞结合。

有表现出这些特征的上清液的杂交瘤被亚克隆, 它们的抗体在纯化后被蛋白 A 亲和层析进一步鉴定。

经过 ELISA 和流式细胞仪的测定, 被筛选的 12 种杂交瘤产生与 HER2/neu 特异性结合的人 IgG1 κ 抗体 (3.F2, 2.E8, 1.D2, 1.B10, 3.B4, 1.F11, 3.D11, 3.D6, 1.H9, 2.G7, 3.E8 和 2.E11)。这些单克隆抗体中的 5 种 (3.F2, 2.E8, 1.D2, 1.B10 和 3.B4) 被纯化并发现与纯化 HER2/neu 和表达 HER2/neu 的人肿瘤细胞结合。这 5 种抗体表现出体外介导细胞裂解性杀灭表达 HER2/neu 的肿瘤细胞并抑制人肿瘤细胞生长。

另外, 一种称作 14.1 \times 3.F2 的双特异性分子, 是将人抗 CD89 抗体 14.1 得到的 Fab'2 片段和人抗 HER2/neu 抗体 3.F2 用标准交联程序通过二硫键进行化学连接而产生 (图 13)。

实施例 4 鉴定抗 HER/neu 的人单克隆抗体和双特异性分子

15

人抗 HER2/neu 抗体和双特异性分子与肿瘤细胞的结合

进一步检测了从五种杂交瘤上清液纯化的由 ELISA 检测出与 HER2/neu 表现显著结合的单克隆抗体 (3.F2, 2.E8, 1.D2, 1.B10 和 3.B4) 与表达高水平 HER2/neu 的肿瘤细胞的结合能力。简言之, 将肿瘤细胞 (如 SKBR-3 或 BT-474) 与抗体或抗体 F(ab')₂ 片段一起孵育, 并洗去未结合抗体。用荧光染料标记的山羊抗人 F(ab')₂ 检测人抗 HER2/neu 抗体与细胞的结合并用流式细胞仪判断平均荧光强度。如图 3A 和 3B 所示, 与对照抗体相比, 抗 HER2/neu 抗体 3.F2, 2.E8, 1.D2, 1.B10 和 3.B4 显示了与表达 HER2/neu 的 SKBR-3 细胞的显著结合。同样, 图 3C 表示抗体 3.F2, 2.E8, 1.D2, 1.B10 和 3.B4 与表达 HER2/neu 的 BT-474 肿瘤细胞在其表面的结合。图 4 证明了 3.F2 和 2.E8 抗体对 HER2/neu 的特异性。抗 HER2/neu 抗体 3.F2 和 2.E8 显示了与表达 HER2/neu 的肿瘤细胞系 SKBR-3 和 BT-474 的显著特异性结合, 而它们并不与表达高水平的与 HER2/neu 受体 (c-erbB2) 同族的 EGF 受体 (c-erbB1) 的 A431 肿瘤细胞系结合。可以用同样方式检测包含人 HER2/neu 抗体或抗体片段的双特异性分子的结合。